INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International reference PCT/EP 99/06131

Box III WORDING OF THE ABSTRACT (continuation of item 5 on sheet 1)

The invention relates to a process for synthesizing Biostatin (TT232) by means of solid phase synthesis on a polymeric support, by synthesizing the peptide stepwise using protective group-derivatized amino acids, according to which the protective groups are eliminated and the peptide is released from a solids phase, with the disulfide bridge being closed by oxidizing the completely or partially synthesized peptide in the presence of a suitable solvent while the peptide is still bound to the solid phase. The invention furthermore relates to a process for synthesizing Biostatin (TT232) by means of peptide synthesis in solution.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nation on patent family members

ernational Application No CT/EP 99/06131

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 505680	A	30-09-1992	HU 60752 A AT 121753 T CA 2060034 A DE 69202182 D DE 69202182 T ES 2074294 T FI 920340 A JP 2514518 B JP 5163299 A US 5480870 A	28-10-1992 15-05-1995 26-07-1992 01-06-1995 31-08-1995 01-09-1995 26-07-1992 10-07-1996 29-06-1993 02-01-1996	
JP 10067796	Α	10-03-1998	NONE		
EP 17536	A	15-10-1980	FR 2451915 A CA 1137467 A DE 3062396 D JP 55162754 A US 4337194 A	17-10-1980 14-12-1982 28-04-1983 18-12-1980 29-06-1982	



_	_	
-	-	ı
_		ı

•

(PCT Rule 61.2).

NOTIFICATION OF ELECTION

From the INTERNATIONAL BUREAU

To

Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT

Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)

in its capacity as elected Office

International application No. PCT/EP99/06131

Applicant's or agent's file reference 18843P WO-1

International filing date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99) Priority date (day/month/year)
20 August 1998 (20.08.98)

Applicant

BRAUM, Günther et al

				Examining A (15.03.00)		Strain Contract	
		.,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		(13.00.00)	A war war	Secretary and the second	Market Service
in a not	ice effecting later ele	ection filed wit	h the Intern	ational Bureau	u on:		
				7 3 X			
The election	[Y]						
THE EIECTION	Mas Was						
	was not						
						i se si i sa	หลังสูติกัดเรา
Rule 32.2(b).	he expiration of 19 r	nonths from th	e priority da	ate or, where	Rule 32 applie	s, within the time	a limit under
							tan di Parkangali. Panggan daka dan
• • •							
-			7				
					3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 -		
	•	•,					
						and the second of the second	Christian Profession of the con-
			, ,				

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Authorized officer

F. Baechler

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES siehe Mitteilung	g über die Übermittlung des internationalen					
18843P WO-1		richts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit hstehender Punkt 5					
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)					
PCT/EP 99/06131	(Tag/Monat/Jahr) 20/08/1999	20/08/1999					
	20/08/1999	20/06/1999					
Anmelder							
ORPEGEN PHARMA GESELLSCHAFT	et. al.						
	And the second s						
Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß							
Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Int	ernationalen Büro übermittelt.						
B	0. '						
Dieser internationale Recherchenbericht umfa X Darüber hinaus liegt ihm jew		er. nannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.					
EX Daraber fillings negriffing	end the ropic der in diedem Bendik ger	amich officiagon zum olung us. Festim bei.					
Grundlage des Berichts							
a. Hinsichtlich der Sprache ist die inter	nationale Recherche auf der Grundlage	der internationalen Anmeldung in der Sprache					
durchgeführt worden, in der sie eing	ereicht wurde, sofern unter diesem Punk	t nichts anderes angegeben ist.					
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))	e ist auf der Grundlage einer bei der Beh	örde eingereichten Übersetzung der internationalen					
3\ "	•	d/oder Aminosäuresequenz ist die internationale					
Recherche auf der Grundlage des S	equenzprotokolls durchgeführt worden, d	las					
in der internationalen Anmel	dung in Schriflicher Form enthalten ist.						
zusammen mit der internation	onalen Anmeldung in computerlesbarer F	orm eingereicht worden ist.					
bei der Behörde nachträglich	n in schriftlicher Form eingereicht worden	ist.					
<u> </u>	n in computerlesbarer Form eingereicht v						
	nträglich eingereichte schriftliche Sequen m Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde v	zprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der vorgelegt.					
Die Erklärung, daß die in co wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form erfaßten Informatio	nen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,					
2. Bestlmmte Ansprüche hat	en sich als nicht recherchierbar erwie	e sen (siehe Feld I).					
3. Mangelnde Einheitlichkeit	der Erfindung (siehe Feld II).						
4. Hinsichtlich der Bezelchnung der Erfin	dung						
X wird der vom Anmelder eing	ereichte Wortlaut genehmigt.						
wurde der Wortlaut von der	Behörde wie folgt festgesetzt:						
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung							
-	wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.						
wurde der Wortlaut nach Re	wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der						
Recherchenberichts eine Ste							
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen is	st mit der Zusammenfassung zu veröffen	tlichen: Abb. Nr.					
wie vom Anmelder vorgesch	lagen	keine der Abb.					
weil der Anmelder selbst kei	ne Abbildung vorgeschlagen hat.						
weil diese Abbildung die Erfi	ndung besser kennzeichnet.						

PCT/EP 99/06131

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
siehe Zusatzblatt
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. X Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recher-chenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Feld III WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt. Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT232) mittels Peptidsynthese in Lösung.

VERTRAGE ER DIE INTERNATIONALE ZUS MENARBEIT F DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE	PCT ************************************					
An Weickmann Weickmann Prechtel Weiss Tiesmeyer Herzog Böhm Liska & Huber Kopernikusstrasse 9 81679 München GERMANY	2 8. FEB. 2000 MITTEILUNG DER ENTSCHEIDUNG ÜBER DEN ANTRAG AUF BERREHAGUNG					
	Absendedatum (Tag/Monat/Jahr) 24/02/2000					
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	ANTWORT FÄLLIG ENTFÄLLT					
18843P WO-1	Siehe aber letzter Absatz unten					
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum					
PCT/EP 99/06131	(Tag/Monat/Jahr) 20/08/1999					
Anmelder						
ORPEGEN PHARMA GESELLSCHAFTet. al.						
Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß die Internationale Recherchenbei der internationalen Anmeldung / in anderen vom Anmelder bei diese hat,						
1. X der Berichtigung zuzustimmen:						
X wie vom Anmelder beantragt.						
im nachstehend angegebenen Umfang*:						
2. die Berichtigung aus folgenden Gründen ganz ode	r teilweise abzulehnen*:					
Ein Exemplar dieser Mitteilung ist zusammen mit einer Kopie des vom Anmelder eingereichten Antrags auf Berichtigung dem Anmelde- amt und dem Internationalen Büro übermittelt worden.						
* Wird die Berichtigung ganz oder teilweise abgelehnt, so kar Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung und unter zusammen mit der internationalen Anmeldung zu veröffentlicher Höhe der Gebühr - PCT- <i>Leitfaden für Anmelder</i> , Band I/A, Anlad	n. Siehe hierzu Regel 91.1f), dritter und vierter Satz, sowie - zur					
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter					
Europāisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Nina Vercio VV Vescio					

付筆

terminal letzte Aminosäure im Sequenzaufbau als N-alpha Boc-geschütztes Aminosäurederivat einzusetzen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Syntheseverfahrens werden die folgenden Schritte durchlaufen:

- Beladung des polymeren Trägers mit dem Anker und/oder dem ersten Aminosäurederivat
- 2. Aufbau der Peptidsequenz
- 3. Knüpfung der Disulfidbrücke
- 4. Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger und/oder der Schutzgruppenabspaltung
- 5. Schutzgruppenabspaltung (sofern nicht bereits unter 4. erfolgt).

Zur Abspaltung der im synthetisierten Peptid enthaltenen Schutzgruppen können literaturbekannte Methoden, z.B. Zugabe von verdünnter Piperidinlösung, angewandt werden.

Die Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls nach an sich bekannten Methoden. Im Fall der säurelabilen Ankergruppen erfolgt die Abspaltung sauer, besonders bevorzugt mit konzentrierter oder verdünnter Trifluoressigsäure.

Die Abspaltung der Schutzgruppen der von der Festphase gelösten Peptide erfolgt in der Regel ebenfalls durch Säurezugabe, bevorzugt wiederum mittels Trifluoressigsäure. Nach der Abspaltung der Peptide können gewünschtenfalls weitere Reinigungs- oder/und Konzentrationsschritte durchgeführt werden. Eine Reinigung kann hierbei vorteilhaft mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die Synthese gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geht in einer besonders bevorzugten Ausführungsform von Fmoc-Threonin(tert.butyl-

ebenfalls möglich, auch wenn die Ausbeuten mit dieser Variante etwas geringer sind.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß nach erfolgter Oxidation und damit intramolekularem Ringschluß über die beiden Cystein-Reste die Reaktionslösung abgedampft werden kann und auf diese Art und Weise das Produkt erhalten wird. Gegebenenfalls wird das Produkt noch gewaschen, z.B. mit Ether, und danach erneut abgesaugt und getrocknet.

Im erfindungsgemäßen Verfahren sind vorzugsweise die folgenden Syntheseschritte nacheinander durchzuführen:

- Kopplung von Ddz-geschütztem Cys (Acm) an tert.-Butyl-geschütztes
 Threoninamid
- 2. Ersatz der Schutzgruppe Ddz durch Trifluoressigsäure,
- 3. Anfügen eines Ddz-geschützten Lysin (Z),
- 4. Ersatz der Ddz-Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure
- 5. Anfügung des Ddz-geschützten D-Trp
- 6. Entfernung der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
- 7. Anfügung des Ddz-geschützten Tyr (Tbu)
- 8. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe und Ersatz durch Trifluoressigsäure
- 9. Anfügen des Ddz-geschützten Cys (Acm)
- 10. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
- 11. Anfügen des Boc-geschützten D-Phe
- 12. Ersatz des Boc durch Trifluoressigsäure
- 13. Oxidation und Aufarbeitung des Produkts durch Abdampfen des Lösungsmittels und Waschen.

In bevorzugten Ausführungsformen wird die Oxidation mit dem voll geschützten Peptid durchgeführt, wogegen in der anderen Ausführungsform in Schritt 11 teilweise bereits die Schutzgruppen entfernt werden, so daß lediglich die Acm-Gruppen am Cystein verbleiben.



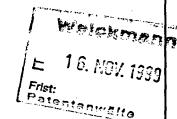
PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

WEICKMANN H. Kopernikusstrasse 9 D-81679 München ALLEMAGNE

From the INTERNATIONAL BUREAU



Date of mailing (day/month/year) 04 November 1999 (04.11.99)	
Applicant's or agent's file reference 18843P WO-1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No.	International filing date (day/month/year)
PCT/EP99/06131	20 August 1999 (20.08.99)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
Not yet published	20 August 1998 (20.08.98)

Applicant

ORPEGEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRODUKTION M.B.H. et al

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Country or regional Office Date of receipt **Priority date** Priority application No. of priority document or PCT receiving Office 20 Augu 1998 (20.08.98) PCT/EP 98/05306 EΡ 02 Nove 1999 (02.11.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Taïeb Akremi W-

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTW

Absender:

MIT DER INTE KTIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Weickmann Weickmann Prechtel Weiss Tiesmeyer Herzog Böhm Liska & Huber Kopernikusstrasse 9 81679 München ALLEMAGNE

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN **PRÜFUNGSBERICHTS**

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

07.12.2000

WICHTIGE MITTEILUNG

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

18843P WO-1

PCT/EP99/06131

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

20/08/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

20/08/1998

Anmelder

ORPEGEN PHARMA GESELLSCHAFT ...et. al.

- 1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- 2. Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Vullo, C

Europäisches Patentamt D-80298 München

Fax: +49 89 2399 - 4465

Tel. +49 89 2399-8061

Bevollmächtigter Bediensteter



PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeich 18843P	nen des Anmelders oder Anwalts WO-1	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internation	ales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum(Tag	g/Monat/Jahr) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)
PCT/EPS	99/06131	20/08/1999	20/08/1998
C07K14/	ale Patentklassification (IPK) oder /655	nationale Klassifikation und IPK	
Anmelder ORPEGI	EN PHARMA GESELLSCH	IAFTet. al.	
	•	üfungsbericht wurde von der mit o nelder gemäß Artikel 36 übermitte	der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte elt.
2. Diese	er BERICHT umfaßt insgesam	nt 7 Blätter einschließlich dieses	Deckblatts.
ι	und/oder Zeichnungen, die ge	ändert wurden und diesem Berich	sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen ht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese	e Anlagen umfassen insgesan	nt 2 Blätter.	
3. Diese	er Bericht enthält Angaben zu	folgenden Punkten:	
ŀ	☑ Grundlage des Bericht	s	
H	☐ Priorität		
Ш	☐ Keine Erstellung eines	Gutachtens über Neuheit, erfind	erische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV	Mangelnde Einheitlichl	keit der Erfindung	
٧	Begründete Feststellur gewerbliche Anwendba	ng nach Artikel 35(2) hinsichtlich (arkeit; Unterlagen und Erklärunge	der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der en zur Stützung dieser Feststellung
VI	☐ Bestimmte angeführte	Unterlagen	
VII	Bestimmte M\u00e4ngel der	internationalen Anmeldung	
VIII	☐ Bestimmte Bemerkung	en zur internationalen Anmeldun	g
Datum der	Einreichung des Antrags	Datum d	ler Fertigstellung dieses Berichts
15/03/20	000	07.12.20	000
	Postanschrift der mit der internatio	onalen vorläufigen Bevollma	ächtigter Bediensteter
<i>၍</i>)	Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 52365	Wimme 6 epmu d	er, G
	Fax: +49 89 2399 - 4465	Tel. Nr	+49 89 2399 7347

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

I.	Grundlage des Berichts								
1.	Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (<i>Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.)</i> : Beschreibung, Seiten:								
	1-28	3	ursprüngliche Fassun	g					
	Pate	entansprüche, Nr.:	:						
	7-13	3	ursprüngliche Fassun	g					
	1-6		eingegangen am		08/11/2000	mit Schreiben vom	08/11/2000		
2.	Hinsichtlich der Sprache: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.						er eingereicht, sofern		
Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht dabei handelt es sich um						r opracine dingereioni,			
	die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (Regel 23.1(b)).						ngereicht worden ist (nach		
		die Veröffentlichun	gssprache der interna	tionalen <i>i</i>	Anmeldung (n	ach Regel 48.3(b)).			
		die Sprache der Über ist (nach Regel 55.		Zwecke	der internatior	nalen vorläufigen Pr	üfung eingereicht worden		
3.	B. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist d internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:								
		in der international	en Anmeldung in schri	ftlicher F	orm enthalten	ist.			
		zusammen mit der	internationalen Anme	ldung in d	computerlesba	arer Form eingereich	nt worden ist.		
		bei der Behörde na	achträglich in schriftlich	ner Form	eingereicht w	orden ist.			
		bei der Behörde na	achträglich in compute	rlesbarer	Form eingere	icht worden ist.			
			s das nachträglich ein It der internationalen A						
			s die in computerlesba entsprechen, wurde vo		erfassten Info	ormationen dem sch	riftlichen		
4.	Aufo	grund der Änderung	en sind folgende Unte	rlagen fo	rtgefallen:				

Seiten:

7-13

Nr.:

☐ Beschreibung,

☑ Ansprüche,

			Zeichnungen, Blatt:
	5.		Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).
			(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diesem Bericht beizufügen).
	6.		vaige zusätzliche Bemerkungen: he Beiblatt
Ü	IV	. Mai	ngelnde Einheitlichkeit der Erfindung
_	1.		die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der nelder:
			die Ansprüche eingeschränkt.
			zusätzliche Gebühren entrichtet.
			zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
			weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
	2.	×	Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
	3.		Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 13.3
			erfüllt ist
		×	aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist: siehe Beiblatt
	4.		ner wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der rnationalen Anmeldung durchgeführt:
		×	alle Teile.
			die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.
	٧.		gründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der verblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
	1.	Fes	tstellung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06131

Neuheit (N) Ja: Ansprüche 1-6

Nein: Ansprüche

Erfinderische Tätigkeit (ET) Ja: Ansprüche 1-6

Nein: Ansprüche

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-6

Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichtes.

Mit Brief vom 8.11.2000 wurden seitens des Anmelders geänderte Ansprüche 1-6 eingereicht.

Obwohl nicht ausdrücklich im Begleitschreiben angewiesen, erscheint es infolgedessen, daß seitens der Anmelder die Rückziehung der ursprünglich eingereichten Ansprüche 7-13 beabsichtigt ist, da diese entweder ähnliche Schutzansprüche darstellen (ursprüngliche Ansprüche 12 und 13), nicht als erfinderisch befunden wurden (ursprünglicher Anspruch 11), oder sich auf eine andere Erfindung beziehen (ursprüngliche Ansprüche 7-10).

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung.

Im Anschluß wird auf folgende Dokumente Bezug genommen (die Reihenfolge der Dokumente entspricht der Reihenfolge ihrer Auflistung im Internationalen Recherchenbericht):

D1: EP-A-0 505 680 (BIOSIGNAL) 30. September 1992 (1992-09-30) in der Anmeldung erwähnt

D5: EP-A-0 017 536 (CLIN-MIDY) 15. Oktober 1980 (1980-10-15)

Die vorliegenden Patentansprüche (eingereicht als geänderte Ansprüche 1-6, mit Brief vom 8.11.2000) erfüllen nicht das Kriterium der Einheitlichkeit der Erfindung gemäß Regel 13.1 PCT.

Unabhängige Ansprüche beinhalten die *Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung* als gemeinsames technisches Merkmal. Dies kann jedoch nicht als "besonderes technisches Merkmal" im Sinne von Regel 13.2 PCT verstanden werden, da es keinen erfinderischen Beitrag zum Stand der Technik darstellt:

Für ein Verfahren zur Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung, kann Dokument D5 als nächstliegender Stand der Technik angesehen werden.

D5 beschreibt die Herstellung von Somatostatin und einiger Analoga durch schrittweisen Aufbau in Lösung (siehe speziell Zusammenfassung und S. 2-4).

Die Peptide werden hierbei, vom C-Terminus beginnend, in Lösung hergestellt. Als Variante wird eine Methode erwähnt, zunächst Heptapeptide herzustellen, und diese danach zu koppeln.

Nach Herstellung des Peptides wird die Disulfidbrücke durch Oxidation geschlossen.

Der Unterschied zu obengenannter Methode besteht somit im Endprodukt.

Das technische Problem liegt somit in der Bereitstellung eines alternativen Produktes.

Die Lösung erscheint trivial, da Biotin ein Analogon von Somatostatin, mit ähnlichen Strukturellen Gegebenheiten, darstellt. Obwohl Biostatin möglicherweise eine zu Somatostatin unterschiedliche Konformation einnehmen könnte, erscheint die Möglichkeit der Herstellung beider Peptide mit derselben Methode als nicht überraschend, vor allem da z.B. in D1 die erfolgreiche Herstellung von Biostatin und Somatostatin mit derselben Methode (Festphasensynthese) beschrieben wird. Der Fachmann würde also versuchen, die Methode von D5 zur Herstellung von Biostatin verwenden. Die Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung kann daher nicht als erfinderisch angesehen werden.

Die vorliegenden Ansprüche stellen daher verschiedene Methoden zur Herstellung von Biostatin dar. Im Detail lassen sich folgende Erfindungen unterscheiden:

- Herstellung nach obengenannter Methode, unter Verwendung von Jod zur Ausbildung der Disulfidbrücken;
- II) Herstellung nach obengenannter Methode, unter Verwendung von Ddz als Schutzgruppe;
- III) Herstellung nach obengenannter Methode, wobei die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen erfolgt.

Derzeit wird jedoch von einer Aufforderung zur Einschränkung oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren abgesehen, um eine zeitgerechte Erstellung des Internationalen Prüfberichtes zu gewährleisten.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT



Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Art. 35(2) PCT hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung.

Neuheit.

Die Synthese von Biostatin in Lösung wurde im Stand der Technik noch nicht 1) beschrieben. Zwar wird in D5 der stufenweise Aufbau von Somatostatin in Lösung beschrieben, jedoch nicht der des Analogons Biotin. Ansprüche 1-6 können somit als neu angesehen werden.

Erfinderische Tätigkeit.

2) Wie unter Punkt IV bereits erläutert, kann die Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung nicht als erfinderisch angesehen werden.

Jedoch unterscheiden sich die Verfahren der vorliegenden Ansprüche hiervon durch die Verwendung von Jod zur Oxidation (Anspruch 1), die Verwendung von Ddz als Schutzgruppe (Ansprüche 3, 5 und 6), sowie der Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen (Ansprüche 2 und 4).

In der Methode von D5 die Oxidation bevorzugt durch Luftsauerstoff oder Kalium ferrocyanid (S. 10), während in der vorliegenden Anmeldung Jod verwendet wird (Beschreibung, S. 27). Ebenso wird auf die Verwendung von Ddz als Schutzgruppe (Anspr. 3, 5 und 6), in Dokument D5 nicht hingewiesen. Weiters, und obwohl aus D5 nicht klar ersichtlich, wird angenommen, daß hierin die Oxidation nach Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt.

Ein erfinderischer Schritt wird daher für Ansprüche 1-6 formell anerkannt, obwohl kein eindeutiger überraschender Effekt ersehen werden kann, welcher durch eine dieser Modifikationen erzielt wird.

- 1 -

PCT/EP99/06131

Patentansprüche

 Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT 232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Disulfidbrücke mittels Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids durch Jod in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchgeführt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz
 (3,5-Dimethoxybenzyl-α,α-dimethyloxycarbonyl oder [2(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-oxycarbonyl]-propyl) verwendet wird.
- Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT 232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet,

dass die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels vor Abspaltung aller Schutzgruppen geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

- Verfahren nach Anspruch 4,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.
- 6. Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT 232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, dass die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise

dass die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird, wobei als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.

10

VERTRAG ÜBE INTERNATIONALE ZUS **GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

TAI

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 18843P WO-1	weiteres vorgehen siehe Mittellung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)						
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum(Tag/Monat/Jahr) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)						
PCT/EP99/06131	20/08/1999 20/08/1998						
Internationale Patentklassification (IPK) oder C07K14/655	nationale Klassifikation und IPK						
Anmelder ORPEGEN PHARMA GESELLSCH	AET at al						
ORFEGEN FRANIVA GLOCLEGON	AFTet. al.						
	 Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt. 						
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt	7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.						
und/oder Zeichnungen, die geä	Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).						
Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.							
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu f	olgenden Punkten:						
I ⊠ Grundlage des Berichts	3						
II □ Priorität							
III Keine Erstellung eines	Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit						
IV 🛛 Mangelnde Einheitlichk	it der Erfindung						
	g nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der rkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung						
VI □ Bestimmte angeführte t	Unterlagen						
VII □ Bestimmte Mängel der	internationalen Anmeldung						
VIII Bestimmte Bemerkunge	en zur internationalen Anmeldung						
Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts						
15/03/2000	08.12.2000						
Name und Postanschrift der mit der internation Prüfung beauftragten Behörde:	nalen vorläufigen Bevollmächtigter Bediensteter						
Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656	Wimmer, G						
Fax: +49 89 2399 - 4465	Tel. Nr. +49 89 2399 7347						

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

I. Grundlage des Berichts

dabei handelt es sich um

3.

4.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06131

1.	. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.): Beschreibung, Seiten:						
	1-28	ursprüngliche Fassung					
	Patentansprüche, Nr.:						
	7-13	ursprüngliche Fassung					
	1-6	eingegangen am	08/11/2000	mit Schreiben vom	08/11/2000		
2.	die internationale Anm	che: Alle vorstehend genannten i neldung eingereicht worden ist, z ohts anderes angegeben ist.			•		

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht;

	die Sprache der Übe Regel 23.1(b)).	ersetzung, die f	ür die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach			
	die Veröffentlichung	ssprache der i	ternationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).			
	die Sprache der Übe ist (nach Regel 55.2	-	ür die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden.			
			nmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäures quenz ist die r Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:			
	in der internationaler	n Anmeldung ir	schriftlicher Form enthalten ist.			
	zusammen mit der ir	nternationalen	Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.			
	bei der Behörde nac	hträglich in sch	riftlicher Form eingereicht worden ist.			
	bei der Behörde nac	hträglich in co	nputerlesbarer Form eingereicht worden ist.			
	Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.					
	Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.					
Auf	grund der Änderunge	n sind folgende	Unterlagen fortgefallen:			
	Beschreibung,	Seiten:				
\boxtimes	Ansprüche,	Nr.:	7-13			

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06131

		Zeichnungen,	Blatt:
5.		angegebenen Gründ	ne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den en nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich ng hinausgehen (Regel 70.2(c)).
		(Auf Ersatzblätter, die beizufügen).	e solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diesem Bericht
6.		aige zusätzliche Bem ne Beiblatt	erkungen:
IV.	Mar	ngelnde Einheitlichk	eit der Erfindung
1.		die Aufforderung zur l nelder:	Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der
		die Ansprüche einge	schränkt.
		zusätzliche Gebühre	n entrichtet.
		zusätzliche Gebühre	n unter Widerspruch entrichtet.
		weder die Ansprüche	eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2.	⊠		gestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat eschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung en aufzufordern.
3.		Behörde ist der Auffas 13.3	ssung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2
		erfüllt ist	
	×	aus folgenden Gründ siehe Beiblatt	en nicht erfüllt ist:
4.		er wurde zur Erstellur nationalen Anmeldun	ng dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der g durchgeführt:
	Ø	alle Teile.	
		die Teile, die sich auf	die Ansprüche Nr. beziehen.
V.			g nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und d rarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06131

Neuheit (N)

Ja: Ansprüche

1-6

Erfinderische Tätigkeit (ET)

Nein: Ansprüche Ja:

Ansprüche

Nein: Ansprüche

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)

Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche

1-6

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

<u>Zu Punkt l</u>

Grundlage des Berichtes.

Mit Brief vom 8.11.2000 wurden seitens des Anmelders geänderte Ansprüche 1-6 eingereicht.

Obwohl nicht ausdrücklich im Begleitschreiben angewiesen, erscheint es infolgedessen, daß seitens der Anmelder die Rückziehung der ursprünglich eingereichten Ansprüche 7-13 beabsichtigt ist, da diese entweder ähnliche Schutzansprüche darstellen (ursprüngliche Ansprüche 12 und 13), nicht als erfinderisch befunden wurden (ursprünglicher Anspruch 11), oder sich auf eine andere Erfindung beziehen (ursprüngliche Ansprüche 7-10).

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung.

Im Anschluß wird auf folgende Dokumente Bezug genommen (die Reihenfolge der Dokumente entspricht der Reihenfolge ihrer Auflistung im Internationalen Recherchenbericht):

D1: EP-A-0 505 680 (BIOSIGNAL) 30. September 1992 (1992-09-30) in der Anmeldung erwähnt

D5: EP-A-0 017 536 (CLIN-MIDY) 15. Oktober 1980 (1980-10-15)

Die vorliegenden Patentansprüche (eingereicht als geänderte Ansprüche 1-6, mit Brief vom 8.11.2000) erfüllen nicht das Kriterium der Einheitlichkeit der Erfindung gemäß Regel 13.1 PCT.

Unabhängige Ansprüche beinhalten die Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung als gemeinsames technisches Merkmal. Dies kann jedoch nicht als "besonderes technisches Merkmal" im Sinne von Regel 13.2 PCT verstanden werden, da es keinen erfinderischen Beitrag zum Stand der Technik darstellt:

Für ein Verfahren zur Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung, kann Dokument D5 als nächstliegender Stand der Technik angesehen werden.

D5 beschreibt die Herstellung von Somatostatin und einiger Analoga durch schrittweisen Aufbau in Lösung (siehe speziell Zusammenfassung und S. 2-4).

Die Peptide werden hierbei, vom C-Terminus beginnend, in Lösung hergestellt. Als Variante wird eine Methode erwähnt, zunächst Heptapeptide herzustellen, und diese danach zu koppeln.

Nach Herstellung des Peptides wird die Disulfidbrücke durch Oxidation geschlossen.

Der Unterschied zu obengenannter Methode besteht somit im Endprodukt.

Das technische Problem liegt somit in der Bereitstellung eines alternativen Produktes.

Die Lösung erscheint trivial, da Biotin ein Analogon von Somatostatin, mit ähnlichen Strukturellen Gegebenheiten, darstellt. Obwohl Biostatin möglicherweise eine zu Somatostatin unterschiedliche Konformation einnehmen könnte, erscheint die Möglichkeit der Herstellung beider Peptide mit derselben Methode als nicht überraschend, vor allem da z.B. in D1 die erfolgreiche Herstellung von Biostatin und Somatostatin mit derselben Methode (Festphasensynthese) beschrieben wird. Der Fachmann würde also versuchen, die Methode von D5 zur Herstellung von Biostatin verwenden. Die Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung kann daher nicht als erfinderisch angesehen werden.

Die vorliegenden Ansprüche stellen daher verschiedene Methoden zur Herstellung von Biostatin dar. Im Detail lassen sich folgende Erfindungen unterscheiden:

- Herstellung nach obengenannter Methode, unter Verwendung von Jod zur Ausbildung der Disulfidbrücken;
- II) Herstellung nach obengenannter Methode, unter Verwendung von Ddz als Schutzgruppe;
- III) Herstellung nach obengenannter Methode, wobei die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen erfolgt.

Derzeit wird jedoch von einer Aufforderung zur Einschränkung oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren abgesehen, um eine zeitgerechte Erstellung des Internationalen Prüfberichtes zu gewährleisten.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Zu Punkt V

B gründete Feststellung nach Art. 35(2) PCT hinsichtlich der Neuheit, der rfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung.

Neuheit.

Die Synthese von Biostatin in Lösung wurde im Stand der Technik noch nicht 1) beschrieben. Zwar wird in D5 der stufenweise Aufbau von Somatostatin in Lösung beschrieben, jedoch nicht der des Analogons Biotin. Ansprüche 1-6 können somit als neu angesehen werden.

Erfinderische Tätigkeit.

2) Wie unter Punkt IV bereits erläutert, kann die Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung nicht als erfinderisch angesehen werden.

Jedoch unterscheiden sich die Verfahren der vorliegenden Ansprüche hiervon durch die Verwendung von Jod zur Oxidation (Anspruch 1), die Verwendung von Ddz als Schutzgruppe (Ansprüche 3, 5 und 6), sowie der Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen (Ansprüche 2 und 4).

In der Methode von D5 die Oxidation bevorzugt durch Luftsauerstoff oder Kalium ferrocyanid (S. 10), während in der vorliegenden Anmeldung Jod verwendet wird (Beschreibung, S. 27). Ebenso wird auf die Verwendung von Ddz als Schutzgruppe (Anspr. 3, 5 und 6), in Dokument D5 nicht hingewiesen. Weiters, und obwohl aus D5 nicht klar ersichtlich, wird angenommen, daß hierin die Oxidation nach Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt.

Ein erfinderischer Schritt wird daher für Ansprüche 1-6 formell anerkannt, obwohl kein eindeutiger überraschender Effekt ersehen werden kann, welcher durch eine dieser Modifikationen erzielt wird.

PCT/EP99/06131

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT 232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren,
 - dadurch gekennzeichnet,

dass die Disulfidbrücke mittels Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids durch Jod in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchgeführt
 wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz (3,5-Dimethoxybenzyl-a,a-dimethyloxycarbonyl oder [2(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-oxycarbonyl]-propyl) verwendet wird.
- Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT 232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels vor Abspaltung aller Schutzgruppen geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

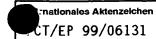
- 2 -

- Verfahren nach Anspruch 4,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.
- 6. Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT 232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, dass die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird, wobei als Schutzgruppen

für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

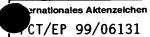




		CT/EP 99	/06131			
A. KLASSI	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C07K14/655					
TLK /	IPK / CU/K14/655					
	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	ssifikation und der IPK				
	RCHIERTE GEBIETE ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo	ole)				
IPK 7	C07K					
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	oweit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen			
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	lame der Datenbank und evtl. verwendete	Suchbegriffe)			
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN					
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.			
	ED O FOE COO A (DIOCICNAL)	The state of the s	1-5			
Υ	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30. September 1992 (1992-09-30)		1-5			
l	in der Anmeldung erwähnt					
İ	see especially the synthesis desc example 1 together with example 3					
Υ	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 11. Mai 1998 (1998-05-11)	19,	1~5			
}	Columbus, Ohio, US;					
	abstract no. 230702,					
	H UNO & S KANAOKA: '"preparation peptides"	of cyclic				
	XP002103315					
	& JP 10 067796 A (SUMITOMO)					
	10. März 1998 (1998–03–10) Zusammenfassung					
	-	-/				
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie				
"A" Veröffer	ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht	tworden ist und mit der			
aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldung nicht kollidiert, sondem nur zum Verständnis des der Effindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist						
Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf						
scheinen zu lässen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden "yv "eröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie kan bicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet						
ausgef		kann nicht als auf erfinderischer Tätigk werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in	einer oder mehreren anderen			
eine Be "P" Veröffer	O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht P" Veröffentlichung, die vor dem intermationalen Aber nach den begrang aber De gleichte der Schale und veräffentliche uns der Schale und					
	dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherches					
19	9. April 2000	28/04/2000				
Name und P	ostanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter				
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk					
	Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Masturzo, P				

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT



		CI/EP 9	7,00131
C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kor	nmenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Υ	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 44, Nr. 5, Mai 1996 (1996-05), Seiten 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP das ganze Dokument		1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., Bd. 30, Nr. 18, 1989, Seiten 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB das ganze Dokument		1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15. Oktober 1980 (1980-10-15) das ganze Dokument		11-13

1

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 00/11032

C07K 14/655

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

2. März 2000 (02.03.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/06131

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99)

(30) Prioritätsdaten:

PCT/EP98/05306

20. August 1998 (20.08.98)

EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPE-GEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOL-OGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRO-DUKTION MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Gunther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemund (DE).
- (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE. ES. FI. GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOSTATIN (TT-232 TRIACETATE) AND ANALOGS THEREOF
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOSTATIN (TT-232 TRIACETAT) UND SEINE ANALOGA

(57) Abstract

The invention relates to a method for synthesising biostatin (TT-232) by means of solid phase synthesis on a polymer support, by gradually building up the peptide using amino acids derivatized with protective groups. According to said method, the protective groups are split off and the peptide is detached from the solid phase. The disulphide bond is closed through the oxidation of the completely or partially synthesised peptide in the presence of a suitable solvent for as long as the peptide remains bound to the solid phase.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird, solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss den PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
ΑT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	ıs	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

09/763013

JC03 Rec'd PCT/PTO 1 5 FEB 2001

WO 00/11032

- 1 -

Verfahren zur Herstellung von BIOSTATIN (TT-232 Triacetat) und seine Analoga

Beschreibung

5

10

15

20

25

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin mittels Festphasensynthese.

Zur Synthese von Peptiden sind dem Fachmann verschiedene Verfahren bekannt. Es handelt sich dabei zum einen um Flüssigphasenmethoden, welche auf Shemyakin (Tetrahedron Lett. (1965), 2323 f.) zurückgehen, und zum anderen um Festphasenverfahren, welche erstmals von Merrifield (R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2149) beschrieben wurden.

Die Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasensynthese sind seither weiterentwickelt und erheblich verbessert worden, es wird hierzu beispielsweise auf "Peptide, Chemie und Biologie", Hans Dieter Jakubke, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford, 1996, ISBN 3-8274-0000-7 verwiesen. Dieses Lehrbuch beschreibt Methoden der klassischen als auch der Merrifield-Peptid-Synthese. Derzeit wird zur Peptidsynthese in erster Linie die Peptidsynthese in Lösung angewandt. Insbesondere bei der Synthese von Peptiden, welche mindestens eine Disulfidbrücke ausbilden sollen, besteht im Hinblick auf die Synthese in Lösung allerdings der der Methode inhärente Nachteil, daß diese Disulfidbrücke durch Oxidation in hoher Verdünnung gebildet werden muß. Dies ist im klassischen Verfahren der Peptidsynthese in Lösung nötig, um die erforderliche örtliche Trennung der einzelnen Reaktionszentren zu bewirken und damit eine effektive Cyclisierung zu ermöglichen.

Das Peptid Biostatin (TT-232) ist ein Analogon des Somatostatins und weist starke in vitro und in vivo Antitumoraktivität auf.

WO 00/11032 PCT/EP99/06131
- 2 -

Somatostatin ist ein natürlich vorkommendes Tetradecapeptid, welches die Bildung von Wachstumshormon und die Sekretion weiterer endokriner Moleküle, wie z.B. Glucagon, Insulin und Gastrin, inhibiert. Somatostatin inhibiert oder reguliert einige Zellfunktionen und es wurde darüber hinaus festgestellt, daß es wichtige endogene antiproliferative Aktivität entfaltet. Es wurde außerdem ein inhibitorischer Effekt von Somatostatin und seinen Analoga auf Tumoren gezeigt. In den letzten Jahren wurden einige Somatostatinanaloga entwickelt, welche längere Wirkungszeiten als das native Hormon und bessere Antitumorwirksamkeit aufweisen. Es wurde daher viel Mühe aufgewandt, tumorselektive Somatostatinanaloga zu entwickeln, wobei insbesondere auch die leichte Herstellbarkeit eine Rolle spielt.

Eines dieser Analoga ist ein Molekül mit einer 5-Ringstruktur mit der folgenden Sequenz:

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂.

Das Molekül wurde TT-232 bzw. Biostatin genannt. Dieses Somatostatinanalogon hat praktisch keinen inhibitorischen Effekt auf die Wachstumshormonsfreisetzung, zeigt aber starke Antitumorwirksamkeit in vivo und in vitro und induziert die Apoptose. Die Verbindung inhibiert die Tyrosinkinase-Aktivität verschiedener menschlicher Darmtumorzellinien, wobei diese Inhibition sehr gut mit der beobachteten Inhibition der Zellproliferation übereinstimmte.

25

30

10

15

20

Die Herstellung von Octa- bzw. Heptapeptid-Derivaten wird beispielsweise in der EP-A-O 505 680 beschrieben. Dort wird aber für eine effektive Cyclisierung über die beiden Cystein-Reste das Peptid zuerst von der festen Phase abgetrennt, die Lösung stark verdünnt und dann die Oxidation bewirkt. Diese Art der Herstellung erfordert aber weitere Aufkonzentrationsund Reinigungsschritte.

WO 00/11032 PCT/EP99/06131

- 3 -

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Verfahren bereitzustellen, durch welches Biostatin besonders leicht und mit besonders hoher Ausbeute an freigesetztem Peptidamid nach der Disulfidoxidation erhalten werden kann.

5

10

Eine weitere Aufgabe war es, die Herstellung von Biostatin in einer solchen Weise zu ermöglichen, daß eine leichte Aufarbeitung des erhaltenen Produkts erfolgen kann.

, **,** ,

Gelöst werden diese Aufgaben zur Synthese von Biostatin (TT 232) in einem ersten erfindungsgemäßen Verfahren durch Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.

20

15

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens angewandte Festphasensynthese kann in dem Fachmann an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Die hierfür geeigneten Festphasenmaterialien, die benötigten Reagenzien, Puffer, Reaktionsbedingungen und einzusetzenden Schutzgruppen für die Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert auf der Feststellung, daß die örtliche Trennung der Reaktionszentren bei der Bildung der Disulfidbrücken in Biostatin in ausreichender Weise gewährleistet ist, wenn die Oxidation erfolgt, solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden ist.

30

Im Rahmen der Erfindung ist es sowohl möglich, direkt nach Synthese desjenigen Teils von Biostatin, welcher die zu verbrückenden Sulfhydryl-

- 4 -

gruppen enthält, eine Oxidation und damit Ausbildung der Disulfidbrücke zu bewirken, und dann das Peptid fertig zu synthetisieren, als auch zuerst das vollständige Peptid zu synthetisieren und danach die Oxidation durchzuführen. Maßgeblich ist jedoch, daß die Oxidation erfolgen muß, solange das Peptid festphasen-gebunden vorliegt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen des Peptids durchzuführen.

Zur Oxidation können alle auch bisher bereits für in Lösung durchgeführte Verfahren bekannte Oxidationsmittel eingesetzt werden. Geeignete Oxidationsmittel sind dem Fachmann daher bekannt. Beispiele für derartige Oxidationsmittel sind Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalze, Jod, Peroxide oder Sauerstoff. Diese Oxidationsmittel werden in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches angewandt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird besonders bevorzugt als Oxidationsmittel Jod, beispielsweise in essigsaurer Lösung oder in einem Lösungsmittel auf Basis von N,N-Dimethylformamid eingesetzt.

20

25

30

5

10

15

Nach abgeschlossener Oxidation erfolgen Waschungen des polymergebundenen Peptids mit verschiedenen Lösungmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen. Hierzu können z.B. N,N-Dimethylformamid, Methanol, Essigsäure und Wasser oder aber auch Lösungen von komplexierenden Reagenzien oder Reduktionsmitteln, wie insbesondere Thiosulfat oder Ascorbinsäure eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft an einer festen Phase durchgeführt, welche eine säurelabile Ankergruppe (acid labile anchoring bond, ALAB) aufweist. Besonders bevorzugt wird als feste Phase ein Polymer, insbesondere Polystyrol, eingesetzt. Vorteilhaft können auch modifizierte Harze verwendet werden, wie Aminomethylpolystyrol (AMPS),

- 5 -

Benzhydrylamin-(BHA-PS) und Methylbenzhydrolamino-polystyrol (MBHA-PS). Die feste Phase kann dabei in für die Festphasensynthese üblicher Form eingesetzt werden. Bevorzugt wird die Festphase in Form von Kügelchen, sogenannter "Beads", eingesetzt.

5

10

15

Geeignete Ankergruppen sind in der Festphasenchemie übliche Anker, welche die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger in einfacher Weise erlauben. Besonders bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung Ankergruppen, welche die Abspaltung des Peptids als Amid ermöglichen. Beispielhafte mit einer säurelabilen Ankergruppe derivatisierte Polymere (ALAB-P) sind 5-(9-amino)xanthen-2yl-)oxyveryl-4'-methyl-benzhydrylaminopolystyrol und 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-aminomethyl-phenoxyacetyl-4''-methyl benzhydrylamino-polystyrol.

Mar Ago

Besonders bevorzugte Ankergruppierungen sind desweiteren 4-Hydroxymethyl-benzoesäure (HBMA), 9-Amino-xanthenyl-3-hydrol (Xant) oder p[(R,5)- α -(1-(9H-Fluoren-9-yl)methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure [MEOBP]. Am meisten bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung die Xant- und die MEOBP-Gruppierung.

20

25

Die Synthese wird im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt mit der Fmoc-/tert. Butyl-Strategie durchgeführt. Dies bedeutet, daß die zum Aufbau des Peptids benötigten Aminosäuren an der Aminogruppe mit einer Fmoc-Schutzgruppe und an den Seitenkettengruppierungen mit tert. Butylgruppen derivatisiert sind. Die Fmoc-Schutzgruppe ist dabei eine temporäre Schutzgruppe, da sie bei der Ausbildung des Peptids abgespalten wird, und lediglich eine Fmoc-Gruppe am N-Terminus des synthetisierten, festphasengebundenen Peptids verbleibt.

30

Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine werden vorteilhaft mit Trityl- oder Acmschutzgruppen derivatisiert. Es ist außerdem besonders bevorzugt, die N-

- 6 -

terminal letzte Aminosäure im Sequenzaufbau als N-alpha Boc-geschütztes Aminosäurederivat einzusetzen.

Im Rahmen des erfindungegemäßen Syntheseverfahrens werden die folgenden Schritte durchlaufen:

- Beladung des polymeren Tragers mit dem Anker und/oder dem ersten Aminosäurederivat
- 2. Aufbau der Peptidsequenz
- 10 3. Knüpfung der Disulfidbrücke

20

25

30

- 4. Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger und/oder der Schutzgruppenabspaltung
- 5. Schutzgruppenabspaltung (sofern nicht bereits unter 4. erfolgt).

Zur Abspaltung der im synthetisierten Peptid enthaltenen Schutzgruppen können literaturbekannte Methoden, z.B. Zugabe von verdünnter Piperidinlösung, angewandt werden.

Die Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls nach an sich bekannten Methoden. Im Fall der säurelabilen Ankergruppen erfolgt die Abspaltung sauer, besonders bevorzugt mit konzentrierter oder verdünnter Trifluoressigsäure.

Die Abspaltung der Schutzgruppen der von der Festphase gelösten Peptide erfolgt in der Regel ebenfalls durch Säurezugabe, bevorzugt wiederum mittels Trifluoressigsäure. Nach der Abspaltung der Peptide können gewünschtenfalls weitere Reinigungs- oder/und Konzentrationsschritte durchgeführt werden. Eine Reinigung kann hierbei vorteilhaft mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die Synthese gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geht in einer besonders bevorzugten Ausführungsform von Fmoc-Threonin(tert.butyl-

- 7 -

ether)amid aus, welches kovalent an eine Polystyrol-Festphase über eine säurelabile Xanthenyl-Ankergruppierung gebunden ist.

In der Folge werden die einzelnen geschützten Aminosäuren zugegeben unter Bildung eines Festphasen-gebundenen geschützten Peptids. Zur Ausbildung der Disulfidbrücke wird das Heptapeptid sodann an der Festphase durch Zugabe von Jod/N,N-Dimethylformamid oder Essigsäure oxidiert und das cyclisierte Heptapeptid durch Säurebehandlung vom Träger abgelöst. Gleichzeitig werden alle Schutzgruppen an Seitenketten des Peptids abgespalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen des Produkts erhalten wird.

20

25

30

5

10

15

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine im Vergleich zum Stand der Technik sehr effektive und einfache Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung. Insbesondere bei der bevorzugten Verfahrensführung unter Verwendung von mit Ddz (3,5-Dimethoxybenzyl-a,a-dimethyloxycarbonyl oder 2[(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-oxycarbonyl]-propyl) als Schutzgruppe derivatisierten Aminosäuren zum Peptidaufbau können hohe Ausbeuten des Produkts auf einfache Weise erhalten werden. Das erfindungsgemäße Verfahren weist außerdem den Vorteil auf, daß nach vollendetem Peptidaufbau in leichter Weise die Oxidation erfolgen kann. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt, die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchzuführen, allerdings ist eine Verfahrensführung mit Abspaltung der Schutzgruppen vor der Oxidation

WO 00/11032

PCT/EP99/06131

- 8 -

ebenfalls möglich, auch wenn die Ausbeuten mit dieser Variante etwas geringer sind.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß nach erfolgter Oxidation und damit intramolekularem Ringschluß über die beiden Cystein-Reste die Reaktionslösung abgedampft werden kann und auf diese Art und Weise das Produkt erhalten wird. Gegebenenfalls wird das Produkt noch gewaschen, z.B. mit Ether, und danach erneut abgesaugt und getrocknet.

10

30

5

Im erfindungsgemäßen Verfahren sind vorzugsweise die folgenden Syntheseschritte nacheinander durchzuführen:

- Kopplung von Ddz-geschütztem Cys (Acm) an tert.-Butyl-geschütztes
 Treonin
- 2. Ersatz der Schutzgruppe Ddz durch Trifluoressigsäure,
 - 3. Anfügen eines Ddz-geschützten Lysin (Z),
 - 4. Ersatz der Ddz-Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure
 - 5. Anfügung des Ddz-geschützten D-Trp
 - 6. Entfernung der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
- 20 7. Anfügung des Ddz-geschützten Tyr (Tbu)
 - 8. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe und Ersatz durch Trifluoressigsäure
 - 9. Anfügen des Ddz-geschützten Cys (Acm)
 - 10. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
 - 11. Anfügen des Boc-geschützten D-Phe
- 12. Ersatz des Boc durch Trifluoressigsäure
 - Oxidation und Aufarbeitung des Produkts durch Abdampfen des Lösungsmittels und Waschen.

In bevorzugten Ausführungsformen wird die Oxidation mit dem voll geschützten Peptid durchgeführt, wogegen in der anderen Ausführungsform in Schritt 11 teilweise bereits die Schutzgruppen entfernt werden, so daß lediglich die Acm-Gruppen am Cystein verbleiben.

- 9 -

Das erfindungsgemäße Verfahren, welches ein zweiter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, ermöglicht eine einfache Peptidsynthese in Lösung, bei der sowohl die Oxidation als auch die Aufarbeitung sehr leicht durchzuführen sind. Durch Oxidation des noch tert.-Butyl-geschützten Biostatins wird eine besonders hohe Ausbeute von ca. 70 bis 80 % der Theorie erhalten.

Weitere Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens können aus den Beispielen 4 und 5 ersehen werden.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern.

Beispiel 1:

5

10

20

25

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

395g Fmoc-MEOBP-MBHA-Harz (Beladung 0,84 mmol/g) werden unter Verwendung von 1,5 l N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt und durch Taumeln gemischt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Die Taumelbewegung wird während aller Waschund Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 1,5 l N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 30 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 L 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

- 10 -

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

5

10

15

25

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 267,1 g (672 mmol) Fmoc-Thr(tBu) in 375 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

20 Stufe 4, Kupplung yon Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 375 N.N-Dimethylformamid, 104,4g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol) Fmoc-Cys(Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol)

- 11 -

HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

5

15

20

25

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5) werden folgende Lösungen vorbereitet: 314,9 g (672 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 157,4 g (336 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

- 12 -

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

5 Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

10

15

20

25

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden folgende Lösungen vorbereitet: 286,8 g (672 mmol) Fmoc-D-Trp in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 143,3 g (336 mmol) Fmoc-D-Trp in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden folgende Lösungen vorbereitet: 308,8 g (672 mmol) Fmoc-Tyr(tBu)



in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt* H_2O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 154,4 g (336 mmol) Fmoc-Tyr(tBu) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt* H_2O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufel 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol)



5

10

15

20

25

30



- 14 -

Fmoc-Cys (Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten

Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

10

15

20

25

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufel 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 178,3 g (672 mmol) Boc-D-Phe in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 89,1 g (336 mmol) Boc-D-Phe in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 400 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

- 15 -

Stufe 15, Umsetzung mit Boc₂O

5

10

15

20

25

30

Das aus Stufe 14 resultierende Produkt wird mit 4 l N.N-Dimethylformamid versetzt und 20 Minuten agititiert. Dann werden 400 g Boc₂O zugegeben, nach 5 Minuten werden in 5 Minuten Abstand 3 Portionen DIEA a 200 ml zugegeben. Nach 1000 Minuten wird abgesaugt, es folgen 5 DMF-Waschschritte (s.o.) a 3 l und 3 analoge MeOH-Waschschritte wobei jeweils 2,5 l MeOH eingesetzt werden. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 833 g polymergebundenes Peptid erhalten.

Stufe 16, Knüpfung der Disulfidbrücke

Zu 833 g polymergebundenem Peptid (0,37 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 15 wird eine Lösung von 416,5 g Jod in 6 l N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 8 l N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 8 l. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l 10 %ige ${\rm Na_2S_2O_3}$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 Waschschritte mit einer Mischung aus 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l Wasser sowie 2 DMF-Waschschritte a 8 l. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 672,4 g (0,45 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) .

Stufe 17, Abspaltung vom Polymer

Zu 672,4 g polymergebundenem Peptid aus Stufe 16 wird eine Lösung von je 120 ml m-Cresol und Wasser in 6 l Trifluoressigsäure (Abspaltreagenz) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach saugt man ab und versetzt das Harz erneut mit Abspaltreagenz. Die erste Nachspaltung wird nach 30 Minuten abgesaugt, es folgen Nachspaltungen

- 16 -

von einer bzw. zwei Stunden Dauer. Die jeweiligen Filtrate werden am Rotationsverdampfer bei 30°C Wasserbadtemperatur im Wasserstrahlvakuum eingedamft. Der Rückstand wird mit 3 I Ether verrührt, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 1,5 I Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden insgesamt 231,85 g Peptid erhalten.

Ausbeute: 13,4% d.Th. über alle Stufen, 14,8% bezogen auf die Abspaltung

10

15

20

25

5

Beispiel 2:

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

3,64 g Fmoc-XANT-Harz (Beladung 0,55 mmol/g) werden unter Verwendung von 25 ml N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt, geschüttelt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Das Schütteln wird während allen Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 25 ml N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 25 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden 2,39 g (6 mmol) Fmoc-Thr(tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und

- 17 -

2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Arninogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

5

15

20

30

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys (Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

25 Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5) werden 2,81 g (6 mmol) Fmoc-Lys(Boc), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und

- 18 -

2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04mL (12mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

5

15

20

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden 2,56 g (6 mmol) Fmoc-D-Trp, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9)
werden 2,76 g (6 mmol) Fmoc-Tyr (tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und
2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese
Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer

- 19 -

(Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzrruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

10 Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

5

15

20

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 11) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys(Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂0 und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

25 Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 13) werden 1,59 g (6 mmol) Boc-D-Phe, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 13) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen

- 20 -

und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 15, Knüpfung der Disulfidbrücke

5

10

15

20

25

Zu 5 g polymergebundenem Peptid (0,30 mMol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 14 wird eine Lösung von 2,5 g Jod in 50 ml N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 50 ml N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 50 ml. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 16 ml N.N-Dimethylformamid und 4 ml 10 %ige Na₂S₂O₃-Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 DMF-Waschschritte. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 4,1 g (0,34 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

Stufe 16, Abspaltung vom Polymer und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen

1 g polymergebundenes Peptid werden 10 mal für je 10 Minuten mit jeweils 5 ml 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan versetzt. Anschließend wird 3 mal mit 5 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten. Die Abspaltlösungen werden gepoolt, eingedampft und 30 Minuten in 2,5 ml Trifluoressigsäure gerührt. Dann wird in 20 ml Ether präzipitiert, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 10 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 332 mg Peptid erhalten.

Ausbeute:

23,9 % d.Th. über alle Stufen,

33,0 % bezogen auf die Abspaltung

- 21 -

Beispiel 3: Disulfid-Oxidation mit Thallium-trifluoracetat

Zunächst wird eine Festphasensynthese wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, jedoch an einem BHA-PS (Beladung 1 mmol/g) das mit MEOBP-Linker beladen wird. Es wird FmocCys(Acm) statt Fmoc-Cys(Trt) verwendet.

136 mg TI(TFA) $_3$ werden in 1 ml N.N-Dimethylformamid gelöst (Oxidations-lösung), 0,5 g polymergebundenes Peptid (0,38 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) werden 5 Minuten mit 3 ml N.N-Dimethylformamid geschüttelt, dann werden 0,725 ml Oxidationslösung zugegeben. Nach 30 minütigem Schütteln bei 25°C wird abgesaugt, und mit je 5 ml der folgenden Lösungsmittel gewaschen: 3x N.N-Dimethylformamid, 3x MeOH, 1 x 10 % HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 3 x 10 % HAc in MeOH, 3 x 10 % HAc in H_2O , 3 x N.N-Dimethylformamid, 3 x MeOH, 3 x H_2O , 3 x MeOH. Es wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 420 mg (0,40 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

20

25

5

10

15

Es werden 0,25 ml Triethylsilan mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt (Abspaltreagenz). 0,4 g polymergebundenes Peptid werden 30 Minuten mit 3 ml Abspaltreagenz geschüttelt, dann wird abgesaugt und 2,5 ml Abspaltreagenz zugegeben. Nach 30 minütigem Schütteln wird abgesaugt, und das Harz noch 1 und 2 Stunden mit je 2,5 ml Abspaltreagenz behandelt. Die Filtrate werden eingedampft, mit je 3 ml Ether verrieben, die dabei anfallenden Niederschläge werden über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 2 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden insgesamt 119 mg Peptid erhalten.

30

Ausbeute: 8,6 % d.Th. über alle Stufen, 8,6 % bezogen auf die Abspaltung

- 22 -

Beispiel 4: Synthese von TT232 in Lösung

1. Ddz-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem 1L-Rundkolben werden 22,8 g (55 mMol) Ddz-Cys(Acm) und 9,32 g (60 mMol) HOBT in 300 mL Ethylacetat gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 18,46 g (57,5 mMol) TBTU und 27,45 mL (0,25 Mol) NMM gegeben. Nach weiterem 5 minütigem Rühren erfolgt Zugabe von 8,71 g (50 mMol) Thr(tBu)-NH₂. Es wird über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 150 mL Benzin versetzt und mit 1 x 100 mL VE-Wasser, 3 x 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 100 mL VE-Wasser, 3 x 100 mL 0,1N HCl, 1 x 100 mL Brine und 1 x 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über 10 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 25,2 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 88 % d.Th.).

2. TFA *Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

18,3 g (32 mMol) Ddz-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 200 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 200 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 100 mL Ethylacetat codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum in einer Mischung aus 30 mL VE-Wasser, 15 mL Ethylacetat und 30 mL Diethylether aufgenommen. Die Phasen werden im Scheidetrichter getrennt, die organische Phase wird noch 2x mit je 10 mL VE-Wasser extrahiert. Die vereinigten Wasserphasen werden mit 3 x 10 mL Ethylacetat/ Diethylether 1:2 (v/v) gewaschen und lyophilisiert. Es werden 11,8 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 80 % d.Th.).

5

10

15

20

25

- 23 -

3. Ddz-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

5

10

20

25

30

In einem Rundkolben werden 12 g (26 mMol) TFA *Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂, 14,34 g (28,5 mMol) Ddz-Lys(Z) und 4,84 g (31,1 mMol) HOBt in 100 mL Ethylacetat gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 9,58 g (29,8 mMol) TBTU und 14,3 mL (0,13 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt. Die klare Reaktionslösung wird mit ca. 50 mL Benzin versetzt und mit 1 x 50 mL VE-Wasser, 3 x 50 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 50 mL VE-Wasser, 3 x 50 mL 0,1N HCl, 1 x 50 mL VE-Wasser und 12 x 20 mL 3 % NaCO₃-Lösung gewaschen, über 5 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 21,9 g glasartig erstarrendes Produkt erhalten (Ausbeute: 100 % d.Th.).

4. TFA*Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

6 g (7,2 mMol) Ddz-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 40 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 40 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 40 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Es werden 3 g Schaum erhalten (Ausbeute: quant.).

Ddz-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

Freisetzung von Ddz-D-Trp aus dem DCHA-Salz:

6,56 g (11 mMol) Ddz-D-Trp*DCHA werden in 20 mL Ethylacetat suspendiert und im Scheidetrichter mit 3 x 20 mL 0,1N HCl und 2 x 10 mL VE-Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft.

- 24 -

In einem Rundkolben werden 5,22 g (7,2 mMol) TFA*Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ das oben erhaltene Ddz-D-Trp und 1,57g (10mMol) HOBT in 40 mL DME gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 3,0 g (9,4 mMol) TBTU und 3,4 mL (0,031 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt. Die klare Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in 40 mL Ethylacetat aufgenommen und mit ca. 10 mL Benzin versetzt. Dann wird mit 1 x 20 mL VE-Wasser und 1 x 20 mL 3 % Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Das Produkt fällt aus, wird abgesaugt und mit PE/EE 2 : 1 gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum werden 4,3 g Produkt erhalten (Ausbeute: 65% d.Th.).

6. TFA* D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

11,2 g (11 mMol) Ddz-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 64 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 64 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 60 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit Ether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 10 g beiger Feststoff erhalten (Ausbeute: 100 %).

7. Ddz-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

Freisetzung von Ddz-Tyr(tBu) aus dem CHA-Salz:

7,38 g (13,2 mMol) Ddz-D-Trp*DCHA werden in 30 mL Ethylacetat suspendiert und im Scheidetrichter mit 3 x 30 mL 0,1N HCl und 2 x 20 mL VE-Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft.

5

10

15

20

25

- 25 -

In einem Rundkolben werden 10 g (11 mMol) TFA*D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂, das oben erhaltene Ddz-Tyr(tBu) und 2,39 g (15,4 mMol) HOBT in 80 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 4,59 g (14,3 mMol) TBTU und 6 mL (0,055 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Dann wird mit 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL kalter 0,1N HCl, 1 x 100 mL Brine und 3 x 20 mL 3 % Na₂CO₃-Lösung gewaschen, über ca. 5 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 11,8 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 87 % d.Th.).

8. TFA*Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

5

10

15

20

25

30

11,8 g (9,5 mMol) Ddz-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 50 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 50 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit Ether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 10,7 g beiger Feststoff erhalten (Ausbeute: 100 %).

9. Ddz-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 4,73 g (11 mMol) Ddz-Cys(Acm), 10,7 g (50 mMol) TFA*Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ und 2,07 g (13 mMol) HOBT in 75 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 3,97 g (12,4 mMol) TBTU und 5,2 mL (0,048 Mol) NMM gegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Ansatz am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in Ethylacetat

- 26 -

aufgenommen, und mit 1 x 30 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. $NaHCO_3$ -Lösung, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 20 mL 0,1N HCl, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. $NaHCO_3$ -Lösung und 1 x 20 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 9,3 g Schaum erhalten (Ausbeute: 70 % d.Th.).

10. TFA *Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

5

10

15

20

25

30

8,9 g (6,3 mMol) Ddz-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 35 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 35 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 60 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 30 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 6,9 g Feststoff erhalten (Ausbeute: 84 %).

11. Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 640 mg (2,4 mMol) Boc-D-Phe, 2,61 g (2 mMol) TFA*Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH $_2$ und 430 mg (2,8 mMol) HOBT in 10 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 830 mg (2,6 mMol) TBTU und 550 μ l (10 mMol) NMM gegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Ansatz am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 x 10 mL VE-Wasser, 3 x 15 mL ges. NaHCO $_3$ -Lösung, 1 x 10 mL VE-Wasser, 3 x 10 mL 0,1N HCl, 1 x 10 mL ges. NaHCO $_3$ -Lösung und 1 x 10 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar

- 27 -

und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 2,1 g amorpher Rückstand erhalten (Ausbeute: 73 % d.Th.).

12. TFA*D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Cys(Acm)-Thr-NH₂

1,44g (1 mMol) Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 7,5 mL Trifluoressigsäure gelöst und 16 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle wird in 75 mL Diethylether präzipitiert. Der Niederschlag wird abgesaugt, gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 1,26 g Pulver erhalten (Ausbeute: 88 %).

13. TT-232 Trifluoracetat

5

10

15

20

25

30

In einem 1L-Rundkolben werden 300 mL Essigsäure (96 %) vorgelegt, 0,215 g (0,15 mMol) TFA*D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Cys(Acm)-Thr-NH₂ werden unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit Argon entgast. Bei 22°C wird über einen Tropftrichter langsam eine Lösung von 92 mg (0,36 mMol) Jod in 6 mL MeOH zugetropft, bis die Reaktionslösung eine dauerhafte, leicht orange Farbe aufweist. Nach 1 h wird so lange eine Lösung von 53 mg (0,3 mMol) Ascorbinsäure in 5 mL VE-Wasser zugegeben, bis die Reaktionslösung entfärbt ist. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 5 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 280 mg Feststoff erhalten (HPLC-Vergleich mit einer Referenz zeigt einen Gehalt von 53 %).

Beispiel 5

Es wird entsprechend Beispiel 4 verfahren, die Knüpfung der Disulfidbrücke wird jedoch am geschützten Peptid vorgenommen.

1. tert Butyl-geschütztes TT232

5

10

15

20

25

Zu 100 mL Essigsäure (96 %) werden in einem Rundkolben 72 mg (0,05 mMol)Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit Argon entgast. Bei 22°C wird über einen Tropftrichter langsam eine Lösung von 92 mg (0,36 mMol) Jod in 6 mL MeOH zugetropft, bis die Reaktionslösung eine dauerhafte, leicht orange Farbe aufweist. Nach 1 h wird so lange eine Lösung von 53 mg (0,3 mMol) Ascorbinsäure in 5 mL VE-Wasser zugegeben, bis die Reaktionslösung entfärbt ist. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, der Rückstand wird in 5 mL Ethylacetat und 2 mL VE-Wasser aufgenommen, die organische Phase wird mit 3 x 2 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 2 mL VE-Wasser, 1 x 2 mL 0,1N HCl und 1 x 10 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Nach Trocknen im Hochvakuum werden 45 mg Rückstand erhalten (Ausbeute: 71 % d.Th.).

2. TT232 Trifluoracetat

39 mg (0,03 mMol) tert Butyl-geschütztes TT232 werden in 230 μ L Trifluoressigsäure gelöst und 16 h bei RT gerührt. Dann wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 1 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 33 mg Produkt erhalten (Ausbeute: 77 %).

Patentansprüche

- Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT 232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase
 abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des
 vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart
 eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das
 Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidation nach Aufbau des vollständigen Peptids bewirkt wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man zur Oxidation ein Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalz,
 Jod, ein Peroxid oder Sauerstoff, und insbesondere Jod in essigsaurer Lösung oder N,N-Dimethylformamid verwendet.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,

daß man als Festphase ein eine säurelabile Ankergruppierung aufweisendes Polystyrol verwendet.

- Verfahren nach Anspruch 5,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die säurelabile Ankergruppierung eine Xanthyl- oder eine MEOBP-Gruppe umfaßt.
- 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man zur Synthese Aminosäuren verwendet, die durch eine FmocGruppierung an der Aminogruppe und durch tertiäre Butylgruppen an
 den Seitenketten geschützt sind.
- 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man Sulfhydryl-Gruppen enthaltende Aminosäuren ebenfalls mit Schutzgruppen versehen verwendet.
- 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Abspaltung des Peptids vom Polymer und die Abspaltung der Schutzgruppen gleichzeitig bewirkt.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Aufreinigung des hergestellten Peptids nach Abtrennung von der Festphase durchgeführt wird.
- 30 11. Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids

WO 00/11032

- 31 -

unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren,

PCT/EP99/06131

dadurch gekennzeichnet,

5

10

daß die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

- 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchgeführt wird.
- 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.